

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2003)11-05-0408-03

血脂康对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 动脉粥样硬化的影响

郑广娟¹, 张文高¹, 张亚同¹, 张云凤², 马学盛¹

(1. 山东中医药大学病理学教研室, 山东省济南市 250014; 2. 北京大学医学部动物科学部, 北京市 100083)

[关键词] 中药学; 血脂康对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响; HE 染色; 血脂康; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 高脂血症; 动脉粥样硬化

[摘要] 观察血脂康对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠高脂血症及动脉粥样硬化的影响。16 只 6 周龄载脂蛋白 E 基因敲除小鼠随机分为高脂血症组 ($n=8$) 和血脂康组 ($n=8$), 相同遗传背景的同龄正常 C57BL/6J 小鼠为正常对照组 ($n=8$)。血脂康组每只灌服血脂康 4 mg/d, 高脂血症组、正常对照组每只灌服生理盐水 0.4 mL/d。连续灌胃 14 周后下腔静脉取血测血脂, 再用 10% 福尔马林灌注后, 取主动脉进行形态学观察及图像分析。结果发现, 高脂血症组血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平明显高于正常对照组 ($P < 0.05$), 但血脂康组血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白水平与高脂血症组相比则明显下降 ($P < 0.05$)。图像分析结果发现, 高脂血症组动脉粥样硬化病变显著, 与正常对照组相比斑块总面积明显增加 ($P < 0.05$); 光镜下多为粥样硬化期, 管壁厚薄不均, 可见由大量泡沫细胞形成的脂纹脂斑期病变和由大量泡沫细胞及胆固醇结晶形成的粥样斑块期病灶; 血脂康组病变较明显减轻, 血脂康组与高脂血症组相比斑块总面积明显减小 ($P < 0.05$), 主要为早期粥样硬化, 管壁厚薄较均匀, 未见明显脂纹脂斑及粥样斑块期病灶; 正常对照组为正常动脉壁, 厚薄均匀, 无动脉粥样硬化病灶。结果提示, 血脂康有降低载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇水平及减轻动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R2

[文献标识码] A

Xue Zhi Kang's Effect in Preventing the Arteriosclerosis of Apolipoprotein E Deficient Mice

ZHENG Guang-Juan¹, ZHANG Wen-Gao¹, ZHANG Ya-Tong¹, ZHANG Yun-Feng², and MA Xue-Sheng¹

(Department of Pathology, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

[KEY WORDS] Xue Zhi Kang; Apolipoprotein E Deficient Mice; Hyperlipidemia; Atherosclerosis; Total Cholesterol; Triglyceride; Low Density Lipoprotein Cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To observe the Xue Zhi Kang's (XZK) effect on blood lipid and atherosclerosis (As) of apolipoprotein E deficient (Apo E⁰) mice. **Methods** Six week old Apo E⁰ mice were assigned randomly into hyperlipidemia group (fed with saline) and XZK group (fed with XZK). Six week old healthy mice (C57BL/6J mice) were the normal group (fed with saline).

They were treated for 14 weeks, then total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDLC) and high density lipoprotein cholesterol (HDLC) were determined, and the aortas were preceded in the formalin for morphological research and photograph analysis. **Results** TC, TG and LDLC of hyperlipidemia group were significantly higher than those of the normal group; TC, TG and LDLC of XZK group were definitely lower than those of hyperlipidemia group ($P < 0.05$). The photography analysis showed that the lesion of hyperlipidemia group was very obvious. Compared with normal group, the total atheromatous plaque square increased obviously ($P < 0.05$). Morphological research showed that As lesions were found in aortas of hyperlipidemia group and XZK group. While As lesions of hyperlipidemia group were more serious than those of XZK group, and no As lesions were found in normal group. **Conclusion** Xue Zhi Kang can lower the serum cholesterol and relieve the As lesions of the Apo E⁰ mice.

载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E deficient,

载脂蛋白 E⁰) 小鼠所致的高脂血症和动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 模型是缘于遗传因素损伤, 其病变特点更接近人类^[1,2]。本研究从血生化和病理形态学变化探讨含有羟甲基戊二酰辅酶 A (hydroxy methyl glutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶抑制剂的调脂中药血脂康对载脂蛋白 E⁰ 小鼠血脂及 As 斑块的影响, 为临床用调脂中药血脂康防治遗传因素

[收稿日期] 2003-02-24 [修回日期] 2003-08-12

[基金项目] 山东省自然科学基金(Y2001C14)资助

[作者简介] 郑广娟, 女, 1964 年 5 月出生, 黑龙江省伊春市人, 副教授, 在读博士, 主要从事中西医结合防治心脑血管病和肿瘤转移的研究工作。E-mail: zgj640@sohu.com。张文高, 男, 1943 年 10 月出生, 河南省嵩县人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病与老年病中西医结合研究。张亚同, 男, 1977 年 8 月出生, 山东省聊城市人, 硕士研究生, 从事中西医结合心脑血管病的研究工作。

相关的高脂血症和 As 提供科学依据, 并为进一步从形态学、基因调控角度探讨其作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

血脂康, 北大维信生物科技有限公司生产, 批号: 20010119。

1.2 研究对象及分组

6 周龄雄性载脂蛋白 E⁰ 小鼠 16 只, 体重 20 ± 2 g, 由北京大学医学院动物科技部提供。随机分为两组: 高脂血症组 8 只, 体重 19.80 ± 1.17 g; ④血脂康组 8 只, 体重 20.62 ± 0.90 g。6 周龄雄性正常 C57BL/6J 小鼠 8 只为正常对照组, 体重 21.96 ± 1.46 g, 由北京协和医科大学动物中心提供。以上三组动物均喂饲 SPF 级普通饲料和 pH 2.8~ 3.0 的酸化水。高脂血症组及正常对照组每只灌服生理盐水 0.4 mL/d, 血脂康组每只灌服血脂康 4 mg/d, 连续灌胃 14 周。

1.3 血脂测定

各组动物麻醉后下腔静脉取血, 由日本 OLYMPUS 公司生产的 AD2700 全自动生化测试仪检测总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。

1.4 病理形态学观察及图像分析

各组动物用 10% 福尔马林灌注后取主动脉, 经美国 AO 公司生产的体视显微镜观察拍照后, 剪开主动脉, 用 OPTIMAS 图像分析仪 (美国) 和 OLYMPUS 显微镜采集图像, 对主动脉面积和斑块面积进行测量分析, 再经石蜡切片 HE 染色, AO 万能研究显微镜观察拍照。

1.5 统计学方法

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 软件对配对资料进行 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 各组血脂水平比较

高脂血症组 TC、TG 和 LDLC 明显高于正常对照组 ($P < 0.05$), 血脂康组 TC、TG 和 LDLC 与高脂血症组相比则明显下降 ($P < 0.05$), 而 HDLC 无明显差异 (表 1, Table 1)。

表 1. 高脂血症组、血脂康组及正常对照组血脂水平比较

Table 1. Comparison of the levels of serum lipids in hyperlipidemia group, XZK group and normal group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, mmol/L)

| 分 组 | 高脂血症组 | 血脂康组 | 正常对照组 |
|------|---------------------------|---------------------------|--------------|
| 总胆固醇 | 13.15 ± 1.14 ^a | 10.67 ± 2.42 ^b | 2.075 ± 0.28 |
| 甘油三酯 | 3.225 ± 0.74 ^a | 1.50 ± 0.41 ^b | 1.30 ± 0.18 |
| HDLC | 1.95 ± 0.97 | 1.32 ± 0.63 | 1.375 ± 0.17 |
| LDLC | 11.02 ± 2.57 ^a | 6.1 ± 3.57 ^b | 1.225 ± 0.17 |

a: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b: $P < 0.05$, 与高脂血症组比较。

2.2 病理形态学变化

2.2.1 体视显微镜观察 高脂血症组主动脉均为灰白色, 不透明状, 斑块大小不等, 以主动脉弓和腹主动脉处斑块最为明显, 斑块处弹性差, 易碎。血脂康组主动脉大部分呈透明状, 主动脉弓和腹主动脉处可见斑点状灰白色斑块, 但面积与高脂血症组比明显减小, 且血管壁弹性较高脂血症组好。正常对照组主动脉管壁透明, 无 As 病灶。

2.2.2 主动脉粥样硬化斑块定量分析 图像分析测量结果发现, 高脂血症组斑块总面积与正常对照组相比明显增加 ($P < 0.05$); 血脂康组斑块总面积与高脂血症组相比明显减小 ($P < 0.05$), 见表 2 (Table 2)。

表 2. 高脂血症组、血脂康组及正常对照组主动脉面积与斑块面积比较

Table 2. Comparison of aortic artery square and atheromatous plaque square in hyperlipidemia group, XZK group and normal group ($n = 8$)

| 分 组 | 动脉总面积 | 斑块总面积 | 斑块总面积/ 动脉总面积 (%) |
|-------|--------|--------------------|---------------------|
| 高脂血症组 | 264.95 | 25.21 ^a | 9.52 |
| 血脂康组 | 292.15 | 6.54 ^b | 2.24 |
| 正常对照组 | 233.95 | 0 | 0 |

a: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b: $P < 0.05$, 与高脂血症组比较。

2.2.3 光学显微镜观察 高脂血症组主动脉管壁厚薄不均, 可见由大量泡沫细胞形成的脂纹脂斑期病变和由大量泡沫细胞及胆固醇结晶形成的粥样斑块期病灶。血脂康组主动脉管壁厚薄较均匀, 可见轻度增厚隆起, 但未见明显脂纹脂斑及粥样斑块期病灶。正常对照组主动脉壁厚薄均匀, 无 As 病灶 (图 1, Figure 1)。

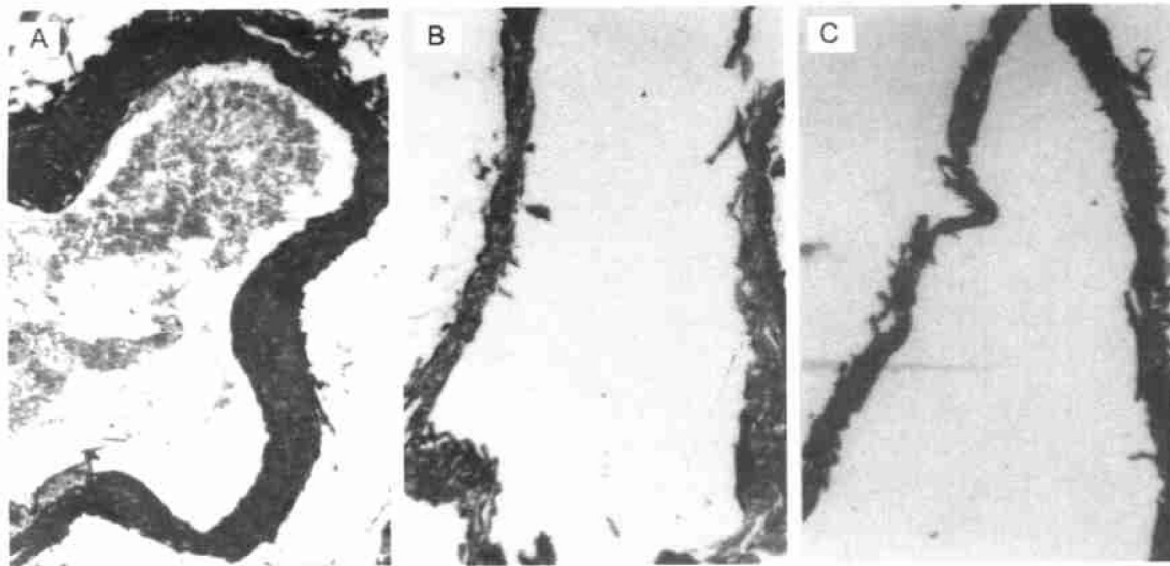


图 1. 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉 (10×10) A: 高脂血症组; B: 血脂康组; C: 正常对照组。

Figure 1. Apo E⁰ mice's aortic artery (10×10) A: hyperlipidemia group; B: XZK group; C: normal group.

3 讨论

载脂蛋白 E 基因敲除 (Apo E⁰) 小鼠在出生 20 周后可发生明显的高脂血症和动脉粥样硬化 (病变可达粥样斑块期)^[3,4]。研究结果显示, 血脂康能降低载脂蛋白 E⁰ 小鼠血清 TC, TG 和 LDLC, 与高脂血症组相比有显著差异 ($P < 0.01$)。经病理学观察及计算机图像分析显示, 血脂康有减轻动脉粥样硬化病变程度、维持血管壁弹性和减少动脉粥样硬化斑块面积的作用。其可能机制为载脂蛋白 E 是除低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 之外的脂蛋白颗粒的结构成分, 它的一个最主要功能就是作为极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 和乳糜微粒残粒受体的高亲和力配体, 从而引起二者被肝脏的摄取、清除。因此, 载脂蛋白 E 基因敲除势必导致肝脏对 VLDL、乳糜微粒的摄取、清除障碍, 而使高含胆固醇的残粒在血浆中的堆积引起高脂血症, 当大量胆固醇类在血管壁沉积时, 则引起动脉粥样硬化^[5-7]。血脂康是含有 HMG-CoA 的还原酶抑制剂。因此推测, 它可能抑制了体内胆固醇在肝脏合成较早阶段的 HMG-CoA 还原酶, 从而减少了胆固醇的合成, 并通过反馈调节, 增加了肝细胞表面 LDL 受体的活性而加速 LDL 的清除。另有研究指

出, 血脂康可通过改善血管内皮舒张功能、保护血管内皮和降低血管内皮细胞的粘附性及抗动脉中膜平滑肌细胞增殖迁移而抗动脉粥样硬化^[8-10]。因此, 血脂康可对抗载脂蛋白 E 基因敲除引发的高脂血症和动脉粥样硬化。

[参考文献]

- [1] 李小鹰. 心血管疾病分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 2000: 117-140
- [2] Breslow JL. Mouse Models of Atherosclerosis. *Science*, 1996, **272**: 685-688
- [3] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW. Apo E⁰ deficient mice develop lesions of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 133-140
- [4] Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powell-Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, Rosenfeld ME. Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. Potential roles of lipid deposition, medial atrophy, and adventitial inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (12): 3593-601
- [5] 李则一, 陈吉棣. 有氧运动和膳食脂肪对 Apo E⁰ 基因缺陷小鼠动脉粥样斑块形成的影响. *中国运动医学杂志*, 2000, **19** (3): 256-260
- [6] 陈近利, 陈吉棣. 有氧运动和膳食脂肪对 Apo E⁰ 基因缺陷小鼠动脉粥样斑块形成的影响. *中国运动医学杂志*, 2001, **20** (1): 5-8
- [7] 胡维诚, 李莉, 陈融, Patti Polinsky, Stephen M Schwartz. 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠心肌微动脉内“微病灶”与外膜炎症. *中国病理生理杂志*, 2001, **17** (11): 1146-147
- [8] 寇文铨. 血脂康基础与临床研究概述. *Chin J Intern Med*, 1998, **37** (6): 364-366
- [9] 程训民, 余宗梅, 骆合德, 邱一华, 陈敏雄. 血脂康对高脂血症患者血管内皮功能的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (3): 235-237
- [10] 黄颖, 陈运贞, 史若飞, 邓国兰. 血脂康抑制高脂血症患者单核细胞粘附. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (1): 53-55

(此文编辑 文玉珊)